

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut

Grete Metsallik

**Proteiinkinaasi CK2 inhibiitori heksaatsetoksümetüülestri ARC-775
stabiilsus rakusöötmes**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: PhD Kaido Viht

Tartu 2020

Infoleht

Proteiinkinaasid mängivad olulist rolli raku töö reguleerimisel. Proteiinkinaasi CK2 ülemäära aktiivsust on seostatud mitmete haiguste tekkega. Seetõttu on CK2 inhibiitorid kujunenud potentsiaalseks ravimiarenduse sihtmärgiks.

Tartu Ülikoolis on arendatud CK2 bisubstraatseid inhibiitoreid, mis suure negatiivse laengu tõttu ei läbi raku plasmamembraani. Ühendeid saab aga rakku viia, kui need derivatiseerida vastavateks hüdrofoobseteks atsetoksümetüülestriteks, mis rakus hüdrolüüsudes vabastavad aktiivse bisubstraatsed inhibiitori. AM-estrit sisaldavad vesilahused pole stabiilsed, sest AM estrid hüdrolyüsuvad ja hüdrofoobsete ühenditena adsorbeeruvad vesilahustega kokkupuutuvatele hüdrofoobsetele pindadele.

Antud töö eesmärk on uurida proteiinkinaasi CK2 inhibiitori heksaatsetoksümetüülestri ARC-775 hüdrolyütilist stabiilsust rakusöötmes.

Märksõnad: proteiinkinaas CK2, inhibiitorid

Stability of hexaacetoxymethyl ester of protein kinase CK2 inhibitor ARC-775 in cell culture medium

Protein kinases play an important role in the regulation of cell function. Excessive protein kinase CK2 activity has been associated with cultivation of several diseases. Because of that CK2 inhibitors have become a potential target for drug development.

Bisubstrate inhibitors of CK2 developed at the University of Tartu have difficulties going through the plasma membrane of the cell largely due to the negative charge. It is possible to derivatize the substrate to the corresponding hydrophobic acetoxymethyl esters that can penetrate the cell. Once inside the cell, it can release the active bisubstrate inhibitor upon hydrolysis. Aqueous solutions of AM-ester are not stabilized as the esters hydrolyze and adsorb to the hydrophobic surfaces in contact with the aqueous solutions.

The aim of this study was to investigate the hydrolytic stability of the protein kinase CK2 inhibitor hexaacetoxymethyl ester ARC-775 in cell culture media.

Keywords: protein kinase, CK2, inhibitors

Sisukord

1. Teema olulisus ja eesmärk.....	5
2. Kirjanduse ülevaade.....	6
2.1. Proteiinkinaasid	6
2.2. Proteiinkinaas CK2.....	7
2.3. Eelravimid.....	9
2.4. CK2-ga seonduvad ARC-tüüpi inhibiitorid.....	12
3. Eksperimentaalne osa.....	14
3.1. Töös kasutatud kemikaalid	14
3.2. Aparatuur ja ja töövahendid.....	14
3.3. Eksperimendid	15
3.3.1. Fluorestsentsdetektoriga HPLC meetodi väljatöötamine	15
3.3.2. ARC-772 kalibratsioon	15
3.3.3. ARC-775 hüdrolyüüsisegu massispektromeetriline analüüs	16
3.3.4. ARC-775 spektrofotomeetriline analüüs.....	16
3.3.5. ARC-775 lagunemine	16
3.3.6. ARC-775 absorptsioon plastikule	17
3.3.7. Rakusöötme pH mõõtmine	17
4. Tulemused ja arutelu.....	18
5. Kokkuvõte.....	24
6. Summary.....	25
7. Kasutatud kirjandus	26
8. Lisad.....	30

Kasutatud lühendid

ACN - atsetonitriil

AM - atsetoksümetüülrühm

ATP - adenosiin-5'-trifosfaat

BPR - biosaadavust parandav rühm

CK2 - proteiinkinaas CK2 (kaseiinkinaas 2)

CK2 α - proteiinkinaas CK2 katalüütiline alaühik, tüüp α

CK2 α' - proteiinkinaas CK2 katalüütiline alaühik, tüüp α'

CK2 β - proteiinkinaas CK2 regulatiivne alaühik

CX-4945 - 5-((3-klorofenüül)amino)benso[c][2,6]naftüridiin-8-karboksüülhape

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - dimetüülsulfoksiid

FDA - Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Ravimiamet

HEPES - 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape

HPLC - kõrgsurvevedelikkromatograafia

K_d - kompleksi dissotsatsioonikonstant

MS - massispektromeetria

PK - proteiinkinaas

RP - pöördfaas

UV/Vis - ultravioleti ja nähtava valguse spektroskoopia

1. Teema olulisus ja eesmärk

Proteiinkinaasid mängivad olulist rolli raku töö reguleerimisel. Ülemäärast proteiinkinaaside aktiivsust on seostatud mitmete erinevate haigustega, näiteks hüpertensioon, Parkinsoni tõbi ja autoimmuunhaigused. Seetõttu on proteiinkinaaside töö reguleerimine kujunenud oluliseks eesmärgiks ravimiarenduses.

Proteiinkinaasil CK2 on palju raku sihtmärke ja see moodustab erinevates kohtades mitmeid signaalikomplekse, mis kajastavad selle kinaasi multifunktsionaalset olemust. CK2 on kujunenud potentsiaalseks terapeutiliseks sihtmärgiks ning CK2 pärssimise strateegiad on kestnud mitmel prekliinilisel uuringul ja hiljuti ka kliinilistes uuringutes. Vähtõve puhul on märgatud CK2 üleekspresseeritust rakkudes. Liigaktiivsuse pärssimiseks on vaja arendada välja inhibiitoreid.

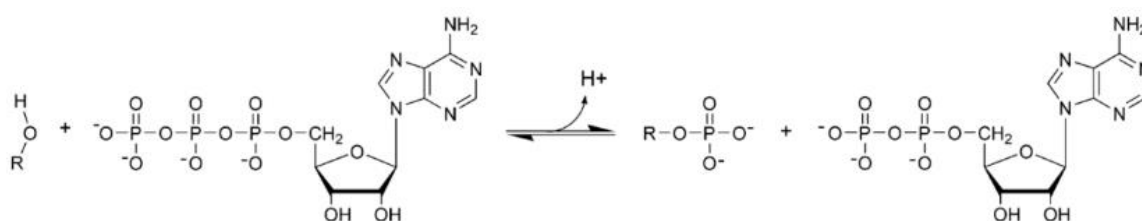
Tartu Ülikoolis on arendatud CK2 bisubstraatseid inhibiitoreid, mis suure negatiivse laengu tõttu ei läbi raku plasmamembraani. Ühendeid saab aga rakku viia, kui need derivatiseerida vastavateks hüdrofoobseteks atsetoksümetüülestriteks, mis rakus hüdroolüüsudes vabastavad aktiivse bisubstraatsed inhibiitori.

AM-estrit sisaldavad vesilahused pole stabiilsed, sest AM estrid hüdroolüüsuvad ja hüdrofoobsete ühenditena adsorbeeruvad vesilahustega kokkupuutuvatele hüdrofoobsetele pindadele. Antud töö eesmärk on uurida proteiinkinaasi CK2 inhibiitori heksaatsetoksümetüülestri ARC-775 hüdroolüütilist stabiilsust rakusöötmes. Töös antakse ülevaade proteiinkinaaside ja täpsemalt CK2 omadustest. Seejärel kirjeldatakse eelravimite tööpõhimõtet ja tekkivaid kitsaskohti. Ekperimentaalses osas viiakse läbi ARC-775 lagunemiskatsed erinevates lahustites.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Proteiinkinaasid

Fosforüülrühma ülekanne on biokeemias fundamentaalse tähtsusega reaktsioon. Proteiinkinaasid (PK) on ensüümid, mis katalüüsivad fosforüülrühma ülekannet ATP-lt aktseptorvalgule (Joonis 1).[1]



Joonis 1. Fosforüülrühma ülekanne ATP-lt aktseptormolekulile

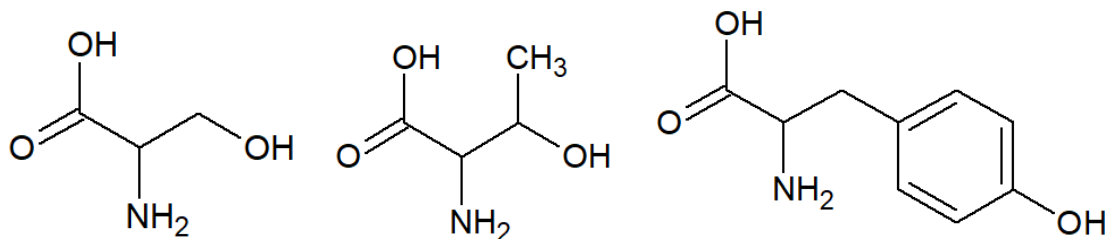
Kuna ATP-l on rakus tähtis roll energia salvestamise näol, siis on selle kontsentratsioon rakus kõrge, tavaliselt vahemikus 2-4 mM. [2] Fosforüülimise toimumiseks on vajalik ka metalliioonide, tüüpiliselt magneesiumioonide sisaldust lahuses. Fosforüülimise tulemusena muutub valgu konformatsioon kas inaktiivsest olekust aktiivsesse olekusse või vastupidi. [3] Valkude defosforüülimist katalüüsivad proteiini fosfataasid.

PK-de pleiotroopsus on äärmiselt varieeruv: mõned neist on spetsialiseerunud ensüümid, mõjutades vaid ühte või mõnda substraati (st fosforülaasi kinaas, Wee1 ja MEK1). Mõned PK-d on aga väga pleiotroopsed, nende kontrolli all on sadade valkudega fosforüülimine.[4]

Inimese kinoom ehk PK-d kodeerivate geenide kogumik koosneb erinevatel andmetel 518 kuni 538 geenist. See moodustab inimgenoomist pea 2%. [5] Ühes rakuliinis on tuvastatud üle 50 000 fosfopeptiidi ja on arvatud, et 75% proteoomist võib olla erinevatel ajahetkedel fosforüülitatud. Inimese fosfoproteoomis on tuvastatud 119 809 fosforüüleeritava aminohappe positsiooni.[6]

PK-d kontrollivad oma valkude aktiivsuse mõjutamise võime tõttu paljusid rakuprotsesse, sealhulgas raku paljunemist, metabolismi ja apoptoosi.[7] Et PK saaks efektiivselt aminohapet fosforüleerida, peab fosforüülitaval substraadil olema kindel peptiidjärjestus, mis seondub PK-ga. Nii fosforüülitavate aminohapete tüüp kui ka neid ümbritsevad aminohappe jäägid mõjutavad seega katalüütilisi parameetreid, põhjustades vastavalt jäägi spetsiifilisuse ja

järjestuse spetsiifilisuse. Jäägi spetsiifilisuse alusel jagunevad proteiinkinaasid seriin/treoniin- ja türosiin-spetsiifilisteks kinaasideks.[8] Eukarüootides on ülekaalus seriini, treoniini ja türosiini fosforüülimine (Joonis 2). On võimalik fosforüülida ka arginiini, lüsiini, histidiini, tsüsteiini, asparagiinhapet ja glutamiini.[2]



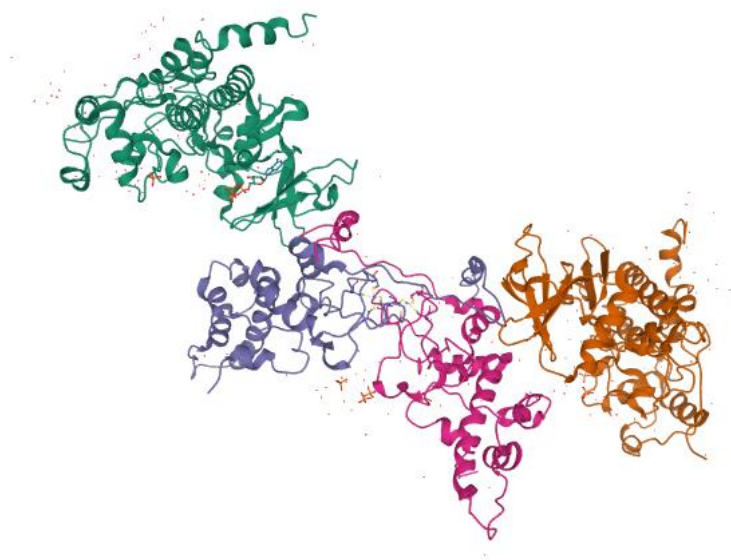
Joonis 2: Seriini, treoniini ja türosiini struktuurivalemid

PK inhibiitorite arenduses domineerivad ATP-sidumistaskusse sihitud inhibiitorid, sest seal on võimalik saavutada tugevat sidumist üsna väikeste inhibiitori molekulidega. Samas, kuna ATP on ühine substraat kõigil kinaasidel, on ka ATP sidumistasku võrdlemisi sarnane ning seetõttu on selliste inhibiitorite korral raske saavutada väga suurt inhibeerimisselektiivsust. Samuti on ATP-konkurentsete inhibiitorite efektiivsus rakus pärssitud konkureeriva ATP kõrge kontsentratsiooni tõttu.

PK aktiivsushäiretega on seotud mitmed haigused. Suur osa PK inhibiitorite arendusi keskenduvad vähi ravi loomisele, kuid töötatakse ka mitmesuguste teiste haiguste ravi nimel, nagu näiteks hüpertensioon, Parkinsoni tõbi ja autoimmuunhaigused.[9] Praeguseks (17.08.2020) on ravimina kasutusel 61 FDA poolt heaks kiidetud kinaasi inhibiitorit.[10]

2.2. Proteiinkinaas CK2

Proteiinkinaas CK2 on laialt levinud pleiotroopne PK, mida leidub nii enamike imetajarakkude tsütosoolis kui ka tuumas. [11] CK2 esineb kõige sagedamini tetrameerina, mis koosneb kahest katalüütilisest (α ja α' , millele vastavad geenid CSNK2A1 ja CSNK2A2) ja kahest regulatiivsest alaühikust (β , geen CSNK2B) (Joonis 3).[12][13] Nii vabad katalüütilised alaühikud kui holoensüüm on katalüütiliselt aktiivsed.[11]



Joonis 3: CK2 holoensüümi kristallstruktuur, roheline ja pruuniga on tähistatud katalüütilised alaühikud ning sinine ja fuksiinpunane on regulatiivsed alaühikud

PK CK2 fosforüülib peamiselt seriini ja treoniini jääke, mis paiknevad rakusisese pH juures negatiivselt laetud aminohappeid (asparagiinhape, glutamiinhape, fosforüülitud aminohapped) sisaldavates valguahelates.[14] Ensüümi poolt äratuntav valksubstraadi järjestus ehk konsensusjärjestus on:

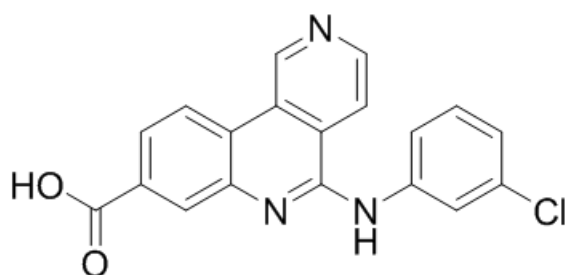


kus S/T/Y on CK2 poolt fosforüülitav aminohape, x ja x' on positiivse laenguta aminohappe jääk, millest x' välistab proliini.[15] CK2 on üks vähestest kinaasidest, mis võib ATP asemel fosforüülrühma üle kanda ka GTP-lt. [16]

CK2 on seotud paljude sihtmärkide fosforüülimisega ja mitmesuguste rakuprotsesside reguleerimisega, mille hulka kuuluvad rakkude diferentseerumine, liikuvus, tsütoskeleti ümberkorraldamine. Huvi CK2 vastu tõuseb, sest on märgatud selle aktiivsuse suurenemist mitmesuguste kasvaja korral ning CK2-1 on tähtis roll raku ellujäämisel ja ta on antiapoptootiline PK.[13] Samuti on leitud CK2 roll uue SARS-CoV-2 viiruse elutsükli.[17] Apoptoos on programmeeritud rakusurma vorm, mille juures on oluline roll proteaaside võrgustikul. Apoptoosis osalevate proteaaside hulka kuuluvad kaspaasid, mis on aspartaadispetsiifilised tsüsteiinproteaasid. Kaspaasid on imetajate rakkude apoptoosi vahendajad. CK2 α' on CASP3 jaoks põhiline regulaator. CASP3 kaskaadi aktiveerimine viib apoptoosi algatamiseni.[15] Kaspaasid sünteesitakse inaktiivsete proensüümidena ja nad vajavad aktiveerimist. On tõestatud, et CK2 fosforüülib apoptoosis osalevaid valke ja mõnel juhul on ka näidatud, et see fosforüülimine kaitseb valku kaspaasipoolse lõhustamise eest. CK2

katalüütiliste alaühikute üleekspressioon põhjustab valkude hüperfosforüülimist, kaspaaside lõhustumise vähenemist, apoptoosi nõrgendatud aktiveerimist ning viib seetõttu ellujäämist soodustava signaali püsimiseni.[18] Protsess on mitmete mehhanismide kaudu rangelt reguleeritud, kuna vead põhjustavad vähktõve teket.[13] Kui CK2 osakaal rakus jõuab kriitilise piirini, võib see luua keskkonna, mis soodustab kasvaja fenotüübi teket ja tugevnemist. [19] Suurenenud CK2 ekspressioon kaitseb rakke indutseeritud apoptoosi eest ja vastupidi, CK2 aktiivsuse mahasurumine indutseerib apoptoosi.[13]

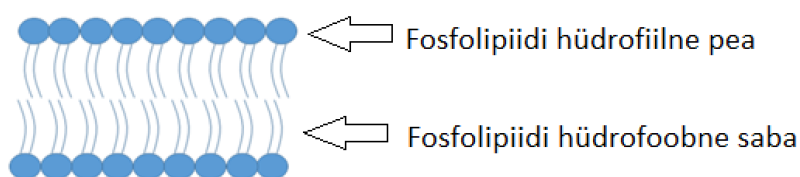
Liigaktiivse CK2 töö pidurdamiseks arendatakse erinevaid inhibiitoreid. Seniks on kliinilistesse katsetesse jõudnud ainult üks ATP-ga konkureeriv inhibiitor, milleks on CX-4945, toimeaine nimetusega silmitasertib (Joonis 4). [20]



Joonis 4: CX-4945 struktuur

2.3. Eelravimid

Iga rakk on ümbritsetud biomembraaniga, mis eraldab rakusisemust väliskeskkonnast. Selle alusmaterjaliks on lipiidne kaksikkiht, milles fosfolipiidide hüdrofoobsed sabad on suunatud üksteise poole membraani sisemusse ning hüdrofiilsed pead kahele poole membraani välis- ja sisepinnale, mis on kokkupuutes vesikeskkonnaga (Joonis 5).

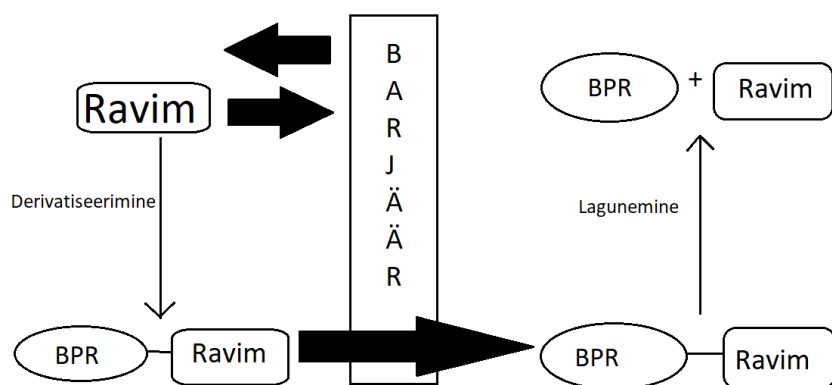


Joonis 5: Biomembraani lipiidne kaksikkiht

Plasmamembraan toimib küll rakku ümbritseva barjäärina, kuid eraldus ei tohi olla täielik, sest raku ja väliskeskkonna vahel peab toimuma pidev aine-, energia- ja teabevahetus. Veel enam, selline vahetus peab olema valikuline ja rakuspetsiifiline. Seetõttu ongi plasmamembraan valikuliselt poolläbilaskev.

Rakusiseste molekulidega seonduvad ravimid peavad olema rakumembraani läbivad, mis seab ravimi omadustele piirangud. Üks moodus on rakku kanda aineid passiivse transpordi abil. Väiksed hüdrofoobsed molekulid lähevad läbi membraani difusiooni teel. Suure molekulmassiga ja hüdrofiilsete molekulide membraani läbimine on takistatud. Selliseid molekule saab rakku transportida valkude abil, mis paiknevad plasmamembraanis või kinnituvad selle pinnale. Antud moodust nimetatakse aktiivseks transpordiks. [1][21]

Eelravimid on ravimite derivaadid, mis metaboliseeritakse või aktiveeritakse kehas aktiivse ravimi vabastamiseks või genereerimiseks - võimaluse korral toimekohas. Näiteks on hematoloogilise vähi raviks heaks kiidetud eelravim, mis on toksiini kaliheamitsiini antikehakonjugaat (Mylotarg).[22]

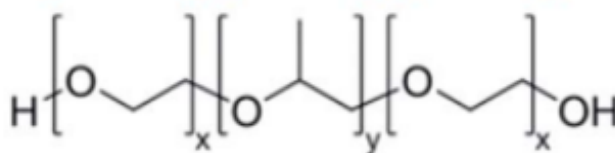


Joonis 6: Eelravimi kontseptsioon, BPR - biosaadavust parandav rühm [23]

Eelravimitehnoloogiaid ei kasutata ainult ravimi toimeainete membraani läbimise parandamiseks, vaid ka biokeemia-alases uurimistöös polaarsete ühendite rakku viimiseks. Raku plasmamembraani mitteläbivaid ühendeid saab rakku sisse viia, kui need vastavalt derivatiseerida, et muuta need ajutiselt membraani läbivaks. Üks levinud võte karboksüülrühmade maskeerimiseks on nende derivatiseerimine atsetoksümetüülestritesks (AM). [24] Seda võtet kasutas edukalt Tsien rakusiseste kaltsiumiindikaatorite arendamisel. Tsien töötas välja lihtsa tehnika, mis laadib Ca^{2+} -selektiivseid kelaatoreid rakkude tsütoplasmasse. Kelaadid muudetakse ajutiselt membraane läbivaks, maskeerides nende neli

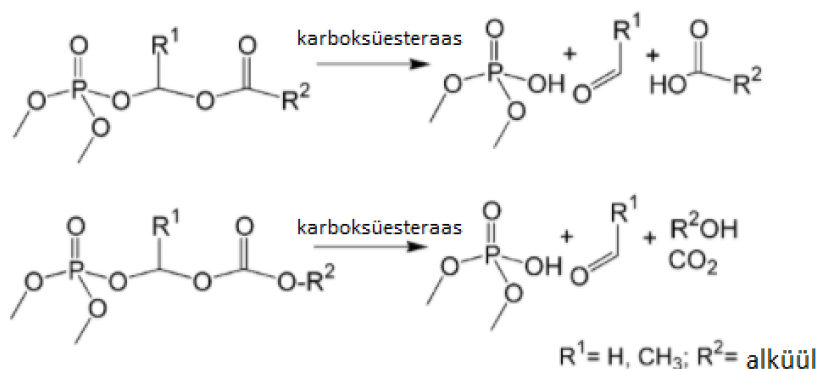
karboksülaati spetsiaalsete esterdatavate rühmadega.[25] Loodud hüdrofoobne molekul difundeerub rakkudesse, kus AM rühmad eemaldatakse ja vabaneb kaltsiumikelaator.[25]

AM-estrid pole hüdrofüütilises keskkonnas stabiilsed ning nende lahustuvus vees on ühendite hüdrofoobsuse tõttu problemaatiline. Seetõttu lahustatakse enamasti AM-estrid DMSO-s ja tehakse lahjendus biokatses kasutatavasse puhvrissi vahetult enne kasutamist. AM-estri vesikeskkonnas püsimise suurendamiseks lisatakse lahusesse pindaktiivset ainet Pluronic F127 (Joonis 7).



Joonis 7: Pluronic (keskmise $M_r=12\ 600$) molekulis on keskmiselt 200,45 oksüetüleeni ja 65,17 2-oksüpropüleeni jääki[26]

Enamik bioaktiveeritavaid maskeerimisrühmi vabastab lagunemisel mürgiseid ühendeid. Atsüüloksümetüülestrid hüdrofüüsuvad karboksüülhappeks ning eraldub aldehüüd (Joonis 8).



Joonis 8: Atsüüloksümetüülestrid hüdrofüüsuvad karboksüülhappeks ning eraldub aldehüüd[27]

Karboksüülhapped satuvad tõenäoliselt metaboolsetesse radadesse. Rakusisesed puhversüsteemid hoiavad raku pH-d stabiilsena.. Tavaliselt tekitab muret just formaldehüüdi vabanemine sellel võimaliku kantserogeensete omaduste tõttu. Füsioloogiline formaldhüüdi kontsentratsioon võib siiski olla üsna kõrge -umbes 100 μM . Vaba formaldehüüd reageerib rakkudes glutatiooniga, mida on rakus rikkalikult ($c \approx 5\text{ mM}$).[27]

2.4. CK2-ga seonduvad ARC-tüüpi inhibiitorid

Proteiinkinaaside töö reguleerimiseks on vaja leida inhibiitoreid ehk aineid, mis suudavad pidurdada ensüümi aktiivsust. Kinaasi katalüütilisel alaühikul on kaks substraadi sidumispäika, üks ATP ja teine valksubstraadi jaoks. [28] Bisubstraatsed inhibiitorid on molekulid, mille struktuuris on ühendatud PK ATP-taskusse ja valksubstraadi sidumispäirkonda seonduvad osad.

Tartu Ülikooli keemia instituudis on dr Asko Uri juhitud uurimisrühmas arendatud bisubstraatsed inhibiitorid koodnimetusega ARC (adenosiini analoogi-peptiidi konjugaadid).

On arendatud mitu seeriat ARC-tüüpi inhibiitoreid, mis inhibeerivad CK2. Need koosnevad aromaatsed heterotsükleid sisaldavast osast, mis seondub CK2α ATP-taskusse, hüdrofoobsest vahelülist ja karboksüülrühmarikkast peptiidist või peptoidist. Bisubstraatsed inhibiitorid, mis seonduvad nii ATP kui valksubstraadi aktiivtsentritega sihtmärk-kinaasi taskus, võiksid samuti lahendada selektiivsuse probleemi. [7]

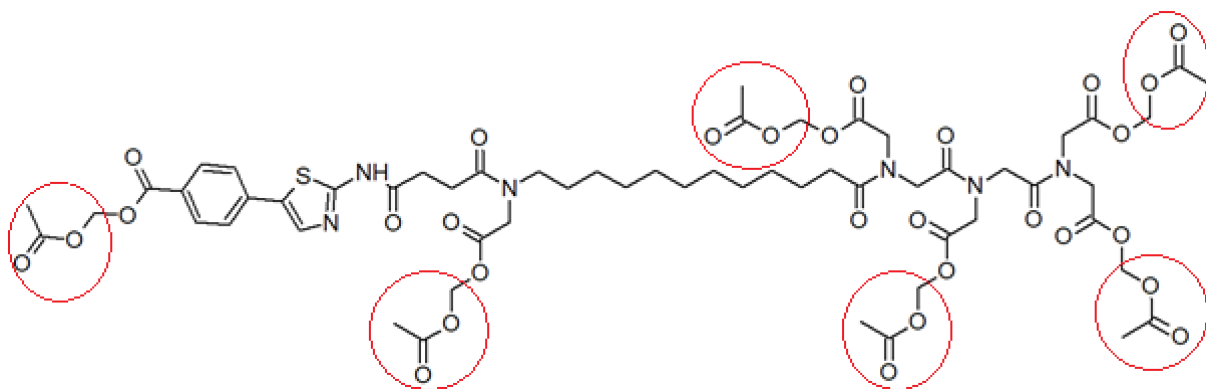
Esimestes CK2 ARC-tüüpi inhibiitorite struktuurides oli ATP-taskusse seonduvaks fragmendiks tetrabromobensimidiasool ning peptiidahelaks oligoaspartaat. Selles seerias on kõige suurema afiinsusega inhibiitor ARC-1502 ($K_d = 0.5 \text{ nM}$), mis on üle kolme suurusjärgu suurem afiinsus kui tetrabromobensimidiasoolil, mis ei olnud oligoaspartaadiga konjugeeritud ($K_d = 640 \text{ nM}$). Samuti on ARC-1502 selektiivsus palju kõrgem kui tetrabromobensimidiasoolil. ARC-1502 fluorestsentsvärvitud derivaat ARC-1504 leiab rakendust fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisel põhineva analüüsimeetodi väljatöötamisel CK2 inhibiitorite sidumiskonstantide määramiseks.[29]

Järgmises töös jätkati tetrabensimidiasoolipõhiste inhibiitorite arendust. Tehti kindlaks, et inhibiitorite seondumisvõime CK2-le sõltub peptiidahelas olevate karboksüülrühmade arvust ning peptiidahelasse kuuluvate aminohapete kiraalsus ei oma afiinsuse seisukohalt tähtsust. Samuti selgus, et peptiidahel on asendatav vastava isomeerse mittekiraalse peptoidahelaga ilma, et inhibiitori seondumisvõime CK2-ga märkimisväärselt väheneks. Vastavatest peptoidahelast sisaldavatest inhibiitoritest oli võimalik valmistada atsetoksümetüülestrid, mis läbisid rakumembraani. Selline lähenemisviis võimaldas CK2-ga seonduvad bisubstraatsed inhibiitorid muuta sobilikuks rakukatsete läbiviimisel.[30]

Seejärel arendati seeria inhibiitoreid, mille ATP-taskusse suunatud struktuuriosaks oli aromaatsne fragment, mis pärines CX-4945 struktuurist. Saavutati enneolematult kõrge sidumisvõime ($K_d = 0,037 \text{ nM}$, ARC-1424-50 ja $K_d = 0,016 \text{ nM}$ ARC-1513-50).[31]

Edasiste arenduste käigus arendati välja seeria inhibiitoreid, mille ATP-taskusse suunatud struktuuriosaks oli aminotiasolüül- või aminoselenasüülbensoehape. Nende struktuuride põhjal arendati välja aeglaselt kustuvad fotoluminestsentssensorid CK2 määramiseks ja CK2 inhibiitorite seondumisvõime iseloomustamiseks.[32]

Konstrueeriti ka aminotiasooli tuuma sisaldav inhibiitor ARC-772 karboksüülhapperikka peptoidipõhise struktuuriosaga, mis võimaldas selle inhibiitori derivatiseerida vastavaks raku plasmamembraani läbivaks heksaatsetoksümetüülestriks ARC-775 (Joonis 9). Vähirakukultuuri töötlemine ARC-775-ga põhjustas CK2 markervalgu Cdc37 fosforüülimistaseme langust ning kaspaasikaskaadi aktivatsiooni ja sellele järgnevat apoptoosi. Kuna aminotiasolüülbensoehappejääk inhibiitori struktuuris on fluorestseeruv, oli võimalik välja arendada tundlik fluorestsentsdetektsiooniga HPLC-meetod ARC-772 kvantifitseerimiseks rakulüsaadis.[33]



Joonis 9: ARC-775 struktuur, märgitud esterrühmad

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Töös kasutatud kemikaalid

- ARC-775 ja ARC-772 sünteesitud Tartu Ülikooli bioorgaanilise keemia õppetooli laboris
- Dimetüülsulfoksiid ja Pluronic F-127 ostetud firmast Sigma Aldrich
- Atsetonitril ja naatriumkloriid ostetud firmast Riedel-de Haen
- HEPES osteti firmast Calbiochem
- Puhvrite valmistamiseks kasutati seadmega Millipore Simplicity 185 (Millipore GmbH) toodetud vett eritakistusega $18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$ ja orgaaniliste lisanditega $<6 \text{ ppb}$.
- Rakusööde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM)

3.2. Aparatuur ja ja töövahendid

- Lahjendusseeria pipeteerimiseks kasutati Thermo Scientific E1-Cliptip automaatpipetti koos samanimelise pipetiotsikuga ruumalaga
- Lahuste pipeteerimiseks kasutati automaatpipetti Ependorf Research Plus
- Lahused valmistati Ependorfidesse Axygen MCT-150-C
- Kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) analüüsiks kasutati Shimadzu Prominence LC Solution HPLC kromatograafi SPD M20A. Fluoretsentsdetektor: RF-20A xs, autosampler: SIL-20A, diodriivide detektor SPD-M20A. Elueerimiseks kasutati ACN/H₂O (0,1% TFA) gradienti 28,8-72,2 % ACN/15 min, voolukiirusega 1 ml/min. Kasutati kolonni Kinetex 5u XB-C18 100A, 250 x 4,6 mm. Süstitav proovi ruumala oli 5 uL, kolonn termostateeriti temperatuuril 40 °C. Iga proovisüsti vahele tehti pesusüst DMSO-ga.
- MS mõõdeti katioonide mõõtmisrežiimis mõõdeti mass-spektromeetriga Shimadzu ESI LC/MS- 2020
- Kontsentratsioonide määramiseks kasutati Nanodrop 2000c spektrofotomeetrit (Thermo Scientific). Kontsentratsioonide arvutamiseks kasutati Beer-Lambert'i seadust:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)cl$$

kus A on neeldumine, ε on neeldumiskoeffitsent ($M^{-1}cm^{-1}$) lainepikkusel l , c on aine kontsentratsioon ning l on optiline teepikkus.

- Lahuste segamiseks kasutati masinat Vortex V-1 Plus Biosan
- Lahuste inkubeerimiseks kasutati termostaati Biosan CH-100
- pH mõõtmiseks kasutati pH meetrit Mettler Toledo SevenEasy pH elektroodiga InLab Expert Pro

3.3. Eksperimendid

3.3.1. Fluorestsentsdetektoriga HPLC meetodi väljatöötamine

Lineaarse tööpiirkonna leidmiseks läbi viimiseks koostati esmalt kalibratsioonigraafik. Graafiku koostamiseks viidi läbi viie punktiga lahjendusseeria ARC-775-st kontsentratsioonidel 10 μM kuni 0.625 μM . Selleks kontrolliti esmalt alglahuse kontsentratsioon Nanodropi abil (epsilon 23 000, $l=0,1$ cm). Lahus lahjendati kontsentratsioonini 10 μM . Ependorfidesse 2-5 lisati DMSO-t. Ependorfis nr 1 oli 10 μM ARC-775 lahus. Viidi läbi kahekordne lahjendusseeria, kandes esimesest ependorfist lahust üle järgmisesse, loputati seda sealolevas DMSO-s, tõsteti teisest ependorfist kolmandasse jne. Sama meetodikaga tehti ka alglahusest üks paralleelkatse. Lahjendusseeria sooritamiseks kasutati pipetti Thermo Scientific E1-Cliptip koos samanimelise pipetiotsikuga. Saadud punkte analüüsiti HPLC abil. Korduskatse viidi läbi viis kuud hiljem kontsentratsioonidel 4 μM kuni 0,25 μM .

3.3.2. ARC-772 kalibratsioon

Viidi läbi viie punktiga lahjendusseeria ARC-772-st kontsentratsioonidel 4 μM kuni 0,25 μM . Selleks kontrolliti esmalt alglahuse kontsentratsioon Nanodropi abil (epsilon 23 000, $l=0,1$ cm). Lahus lahjendati kontsentratsioonile 4 μM . Ependorfidesse 2-5 lisati DMSO-t. Ependorfis nr 1 oli 10 μM ARC-772 lahus. Viidi läbi kahekordne lahjendusseeria, kandes esimesest Ependorfist lahust üle järgmisesse, loputati seda sealolevas DMSO-s, tõsteti teisest Ependorfist kolmandasse jne. Sama meetodikaga tehti ka alglahusest paralleelkatse. Lahjendusseeria sooritamiseks kasutati pipetti Thermo Scientific E1-Cliptip koos samanimelise pipetiotsikuga. Saadud punkte analüüsiti HPLC abil.

3.3.3. ARC-775 hüdrolüüsisegu massispektromeetriline analüüs

Massispektrimeetrilise analüüsi läbiviimiseks tehti esmalt HPLC analüüs ARC-775 lahusest DMSO-s. Seejärel segati kokku ARC-775 lahus DMSO-s ning DMEM rakusööde vahekorras 1:1 (ARC-775 lõppkontsentratsioon 436 μM). Mõlemad lahused inkubeeriti eelnevalt 30 min 30 °C juures. Rakusöötme lisamisel märgiti üles katse alguse kellaaeg. Esimene süst tehti vahetult peale kokkusegamist, teine süst tehti kolm tundi peale kokkusegamist.

3.3.4. ARC-775 spektrofotomeetriline analüüs

Viidi läbi ARC-775 spektrofotomeetriline analüüs. Selleks tehti 10 mM ARC-775 lahus kuivas DMSO-s. Saadud lahusest tehti kahekordne lahjendusseeria, kandes esimesest Ependorfist lahust üle järgmisesse, loputati seda sealolevas DMSO-s, tõsteti teisest Ependorfist kolmandasse jne. Sama meetodikaga tehti ka alglahusest paralleelkatse. Lahjendusseeria sooritamiseks kasutati pipetti Thermo Scientific E1-Cliptip koos samanimelise pipetiotsikuga. Saadud lahustel mõõdeti Nanodropi abil absorptsiooni. Kasutati automaatselt muudetava optilise teepikkusega režiimi, mis hiljem arvutas tulemused ümber vastama teepikkusele 0,1 cm. Iga proovi järel pesti masinat DMSO-ga.

3.3.5. ARC-775 lagunemine

ARC-775 puhvris lagunemise uurimiseks määrati esmalt Nanodropiga alglahuses ARC-775 kontsentratsioon. Seda lahjendati DMSO-s, et saada 5 μM ARC-775 lahus.

Seejärel tehti Pluronic F-127-t sisaldav lahus. Selleks võeti suurema ARC-775 sisaldusega alglahus, mille kontsentratsioon määrati Nanodropi abil. Tehti lahus DMSO-s, mis sisaldaks 500 μM ARC-775 ja 10% Pluronic F-127-t. Lahuseid analüüsiti HPLC abil.

ARC-775/Pluronic F-127/DMSO lahust lahjendati kontsentratsioonini 5 μM eelnevalt 30 °C juures inkubeeritud puhvris (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005 % Tween20). Märgiti kokkusegamise kellaaeg. 5 minuti möödudes võeti lahust ja segati see suhtega 1:5 ACN hulka. Seejärel proov tsentrifuugiti (4 °C, 15 300 rpm, 20 min) ning viidi läbi HPLC analüüs. Samamoodi võeti proovid ajahetketel 1h, 2h, 3h ja 4h. ARC-775 lagunemist DMEM rakusöötmes uuriti analoogse meetodikaga nagu lagunemist puhvris.

3.3.6. ARC-775 absorptsioon plastikule

ARC-775 absorptsiooni uurimiseks kasutati 5 μ M ARC-775 lahust DMSO-s. Lahus jagati nelja Ependorfi. Seejärel pipeteeriti lahust edasi-tagasi pipetiotstes, esimest lahust 0 korda, teist lahust 1 kord jne. Katset korrati teises paralleelis.

3.3.7. Rakusöötme pH mõõtmine

Rakusöötme pH mõõtmiseks kalibreeriti pH meeter. Seejärel asetati elektrood rakusöötme lahusesse ning registreeriti tulemus.

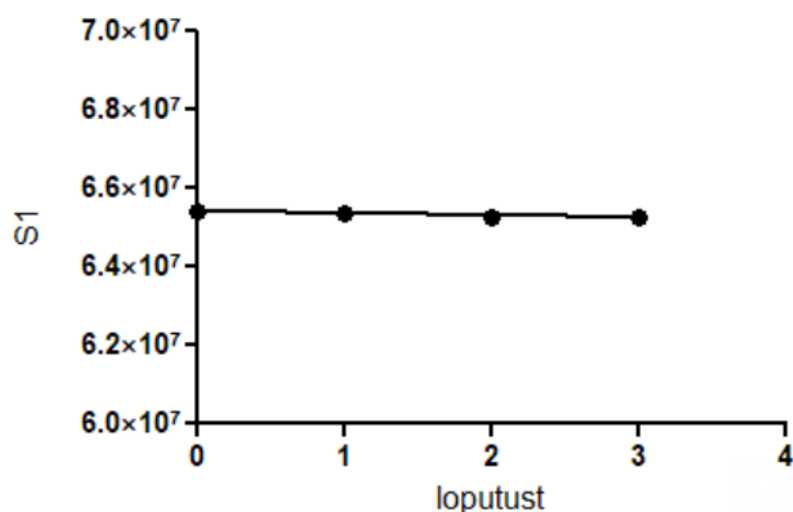
4. Tulemused ja arutelu

Antud töö eesmärk oli uurida proteiinkinaasi CK2 inhibiitori ARC-772 heksaatsetoksümetüülestri ARC-775 stabiilsust puhvris ja rakusöötmes. ARC-775-ga on tehtud rakukatseid järgides kirjanduses soovitatud protokolle, kuid pole täpsemalt uuritud, kui kaua ARC-775 neis puhvris püsib.[33]

Kasutati fluorestsentsdetektsiooniga HPLC meetodit, võttes eeskju varasemalt välja töötatud fluorestsentsdetektsiooniga HPLC meetodist ARC-772 määramiseks.[33] Kasutati varem samas laboris optimeeritud gradienti, mille korral ARC-775 retentsiooniaeg oli 14,8-14,9 minutit (Lisa 6) ja ARC-772 puhul 6,1-6,3 minutit (Lisa 13).

ARC-775 on hüdrofoobne molekul ja seega vesilahustes hüdrolüüsumise tõttu üsna ebastabiilne (Joonis 14). Samuti on probleemiks aine adsorptsioon laboriplastikule. DMSO lahustab vähepolaarseid molekule üsna hästi, seguneb veega ning elusorganismid taluvad seda küllaltki hästi, mille tõttu sobib bioaktiivsete ühendite lahustamiseks. Rakud taluvad madalas kontsentratsioonis DMSO-d hästi (alla 0.5%). Alglahused tehakse DMSO-s ning lahjendatakse puhvrissi, kus AM-estri solubiliseerimiseks kasutatakse pindaktiivset ühendit Pluronic F-127.[34] Soovitatakse vältida seerumi lisamist rakusöötmesse, sest sellist vesilahust ei saa pikalt säilitada.

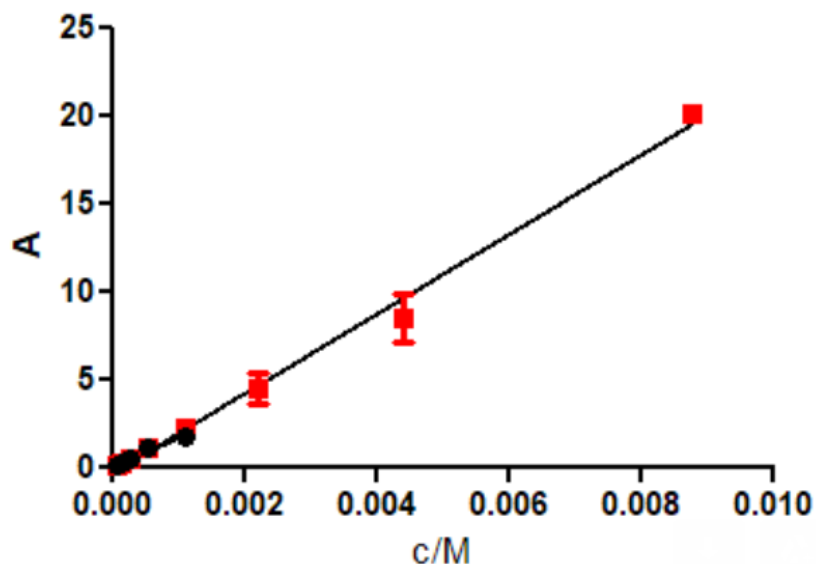
DMSO takistab ARC-775 absorbeerumist plastikule (Joonis 10), mis kindlustab katse käigus väiksemad kaod.



Joonis 10: ARC-775 adsorptsioon Thermo Scientific E1-Cliptip pipetiotsikutele, $S = 6,542e-52377x$

Katse tulemused näitavad, et märgatavat kadu ARC-775 kogusele ei teki, kui seda loputada plastikust pipetiotsades. Katses kasutati 5 μM ARC-775 lahust DMSO-s. Kadu oli peale igat loputust keskmiselt 0,02 % ainest.

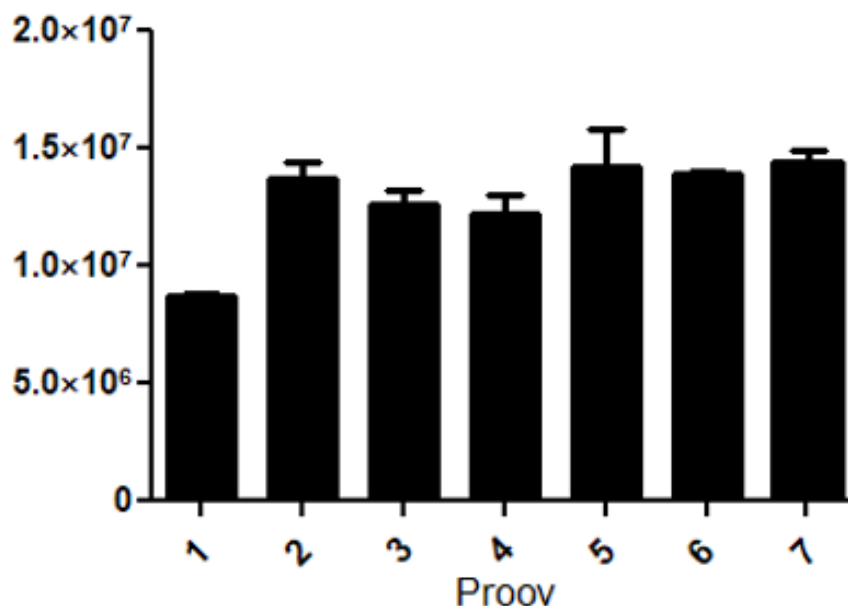
ARC-775 spektrofotomeetriliseks uurimiseks viidi läbi katse lahjendusseeria analüüsiga (Joonis 11).



Joonis 11: ARC-775 absorptsiooni sõltuvus kontsentratsioonist, must – tavaprogramm, punane - automaatselt muudetava optilise teepikkusega programm, $A(\text{tava}) = 0,06401 + 113,1x$, $A(\text{auto}) = 0,2204 + 61,55x$

Katse läbiviimiseks tehti kanged ARC-775 emalahused DMSO-s. Kasutades Beer-Lambert'i seadust $A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)cl$ on võimalik välja arvutada täpne ARC-775 kontsentratsioon lahuses. Kuna antud lahuste absorptsioon on väga suur, siis oli vaja kasutada Nanodropi automaatse optilise teepikkuse vähendamise funktsiooni, mis vähendab optilist teepikkust kuni usaldusväärse absorptsiooni tulemuse saamiseni ja hiljem arvutab saadus absorptsiooni väärtused ümber 0,1 cm teepikkuse jaoks. Tulemustest on näha, et kuni kontsentratsioonini 9 mM kontsentratsioonini (arvutuslik absorptsioon 20 lähedal) pole graafiku kõverdumist näha ja võib kasutada lineaarset võrrandit.

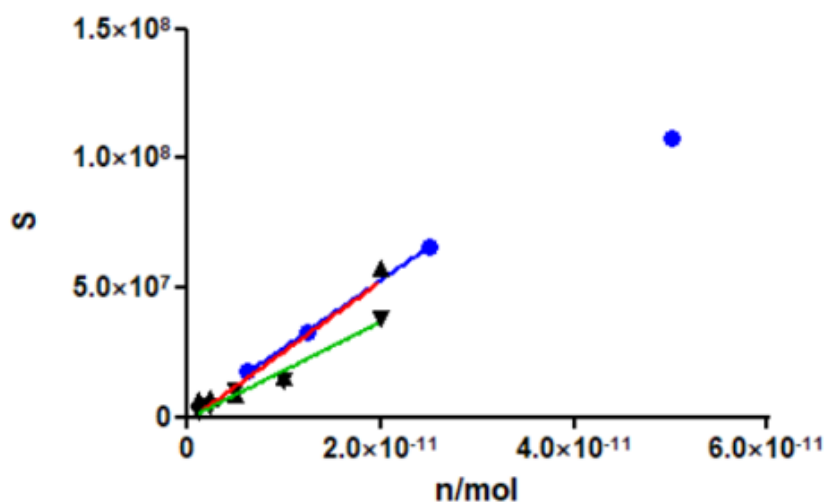
Antud töös viidi läbi lagunemiskatseid erinevates orgaanilistes lahustites, et leida optimaalne proovi ettevalmistusviis vältimaks vesilahuses solubiseeritud ARC-775 kadu adsorptsiooni tõttu analüüsiaparatuuri pindadele- pipetiotsikutele, Ependorfidele jms (Joonis 12).



Joonis 12: Proovi ettevalmistuse optimeerimine. DMSO lahuse analüüsil selgus, et ARC-775 ei kinnitu plastikule. X-teljel: 1. HEPES puhver 2. DMSO 3. HEPES puhver Pluronic F127-ga 4. 2:1 HEPES puhver Pluronic F127-ga : ACN 5. 1:1 HEPES puhver Pluronic F127-ga : ACN 6. 1:2 HEPES puhver Pluronic F127-ga : ACN 7. 1:4 HEPES puhver Pluronic F127-ga : ACN. Y-teljel ARC-775 signaali piikide summaarne pindala.

Graafikul on näha, et enamik proovitud lahustitest jääb DMSO-ga sarnasesse signaalialasse. Kõige halvemad tulemused andis lahus puhvris (Proov 1), kus on näha madalamat signaali. Sellest võib eeldada, et ARC-775 adsorbeerub vesilahusest plastikule. Tulemust parandas Pluronic F-127 lisamine puhvrisse (Proov 3). Kõige paremaks võib lugeda tulemused lahusega, kus lahustiks oli puhver Pluronic F-127 ja atsetonitriili segu, kus atsetonitriili osakaal oli vähemalt pool lahustist (Proov 5, 6, 7).

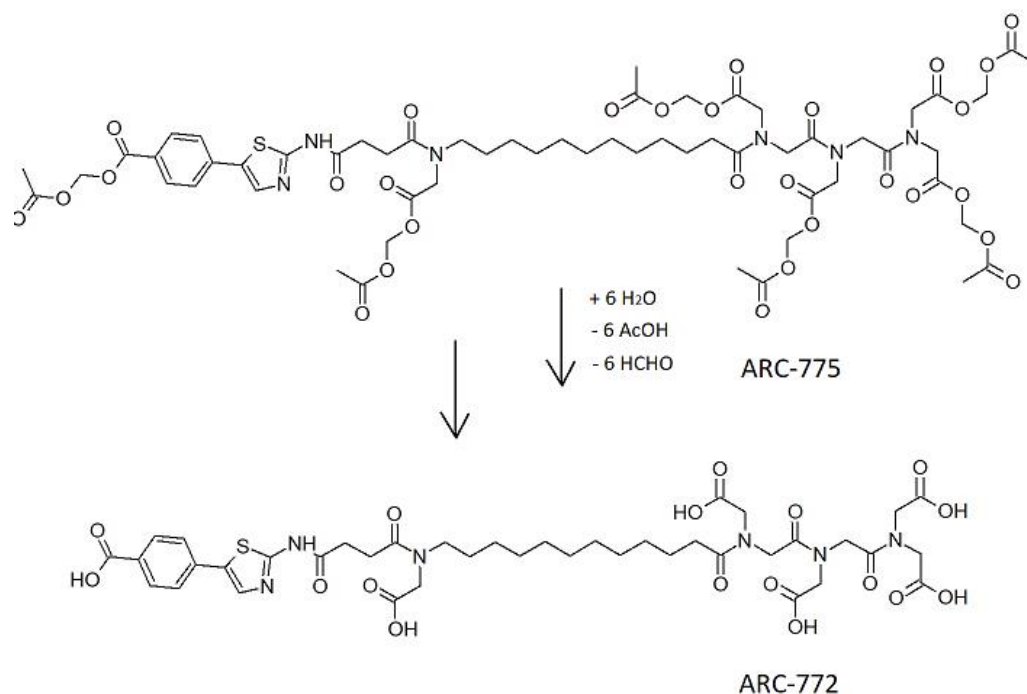
Proovide ettevalmistusteks viidi läbi HPLC kalibratsioon, et määrata HPLC meetodi lineaarne ala (Joonis 13). Kasutati lahjendusi vahemikus 4 µM kuni 0,25 µM. Kasutati varasematest katsetest tuntud gradienti, mis lahutab hästi ARC-775 ja selle hüdroliüüsisaadused. Katses tuvastati ained neeldumise ja fluorestsentsi järgi. Neeldumismaksimum, on ARC-775 337 nm juures ja ARC-772 332 nm juures (Lisa 3,4).



Joonis 13: Kalibratsioonigraafik, y-teljel ARC-ifluorestseerunud osa signaali pindala, x-teljel lahuse kontsentratsioon, 1) sinine - $S(\text{ARC-775}_1) = 4,15644 + 2,514e16x$, 2) punane - $S(\text{ARC-775}_2) = 1,793e6 + 1,724e17x$, 3) roheline - $S(\text{ARC-772}) = -763046 + 9,393e6x$

Tulemustest on näha, et sama neeldumisega ARC-775 lahus annab pisut suurema signaali kui ARC-772. Kolonnis järgmisele proovile edasikanduv jääk jäi sõltumata lahuse kontsentratsioonist stabiilselt 0,1% juurde, seega võib selle lugeda tühiseks.

Viidi läbi katse ARC-775 hüdrolüüsisegu massispektromeetriliseks analüüsiks, et tuvastada ARC-775 lagunemisel tekkinud fragmendid. ARC-775-l on kuus esterrühma. Kuna vesilahuses pääsevad vee molekulid kõigile esterrühmadele vabalt ligi, siis toimub lagunemine võrdlemisi juhuslikus järjekorras ning võib moodustuda mitmeid erinevaid fragmente (Joonis 14, Tabel 1).

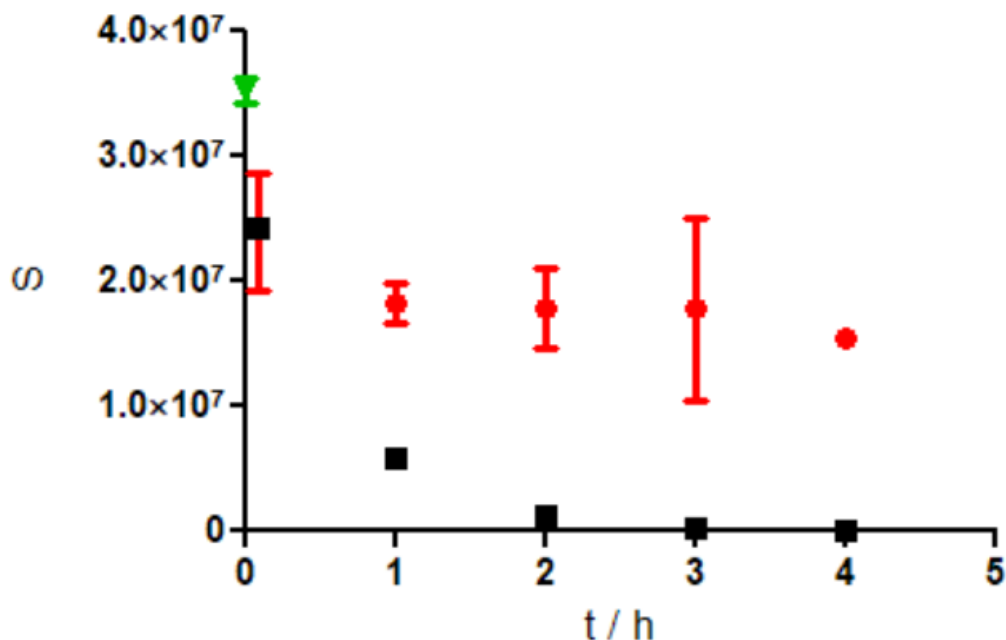


Joonis 14: ARC-775 lagunemine ARC-772-ks. Aine struktuurid on esitatud neutraalidena

AM rühmade arv	Molekulmass	Isomeeride arv
6	1352	1
5	1280	6
4	1208	30
3	1136	120
2	1064	360
1	992	6
0	920	1

Tabel 1: Võimalik hüdrolüüsil tekkivate isomeeride arv ja molekulmassid

ARC-775 stabiilsuse uurimiseks HEPES puhvris ning rakusöötmes viidi läbi lagunemiskatsed (Joonis 15).



Joonis 15: ARC-775 lagunemine, must - lagunemine söötmes, punane - lagunemine puhvris, roheline 5 μM ARC-775 DMSO-s

Tulemused näitavad, et ARC-775 lagunemine esimese 5 minuti jooksul peale kokkusegamist on kahes lahuses üsna sarnane, kuid edasi on lagunemine rakusöötmes tunduvat kiirem. Põhjuseks võib olla lahustite erinev pH. DMEM rakusöötme pH on 8,62, võrdluspuhvri pH oli 7,5. Aluselisemas keskkonnas on esterrühmade lagunemine soodustatud.

Katsetest selgub, et AM estrite korral on oluline piisavalt kiiresti töötada, sest neid ei saa vesilahustes pikalt stabiilsena hoida. Rakukatsete puhul tuleks need kohe rakkudele peale viia, et vältida aine lagunemist enne katse algust.

5. Kokkuvõte

Töö eesmärk oli uurida proteiinkinaasi CK2 inhibiitori heksaatsetoksümetüülestri ARC-775 hüdrofüütilist stabiilsust rakusöötmes. ARC-775-ga on tehtud rakukatseid järgides kirjanduses soovitatud protokolle, kuid pole täpsemalt uuritud, kui kaua ARC-775 neis puhvris püsib.

Töös viidi läbi lagunemiskatsed rakusöötmes. ARC-775 lagunemine rakusöötmes oli tunduvalt kiirem kui puhvris. Tulemusi saab põhjendada pH erinevuste põhjal. Mida aluselisem oli keskkond, seda kiiremini ARC-775 lagunes. Samuti kinnitatakse töös, et sarnaselt kirjanduses esitatud andmetele on ARC-775 stabiilne DMSO lahusena pika aja vältel.

Antud tulemusi saab kasutada edasistes uuringutes paremaks katse planeerimiseks, kus tuleb arvesse võtta rakusöötme omadusi ning ARC-775 stabiilsust vesilahustes.

6. Summary

The aim of this study was to investigate the hydrolytic stability of the protein kinase CK2 inhibitor hexacetoxymethyl ester ARC-775 in cell culture medium. Cell experiments with ARC-775 have been performed following the protocols recommended in the literature, but the stability of ARC-775 in these buffers has not been further investigated.

Degradation experiments in cell culture were performed. Degradation of ARC-775 in cell culture medium was significantly faster than in buffer. The results can be explained by pH differences. The more basic the environment, the faster the ARC-775 decomposed. The work also confirms that, similar to the data reported in the literature, ARC-775 is stable as a DMSO solution for a long time.

These results can be used in future studies to better design the experiment, taking into account the properties of the cell culture medium and the stability of ARC-775 in aqueous solutions.

7. Kasutatud kirjandus

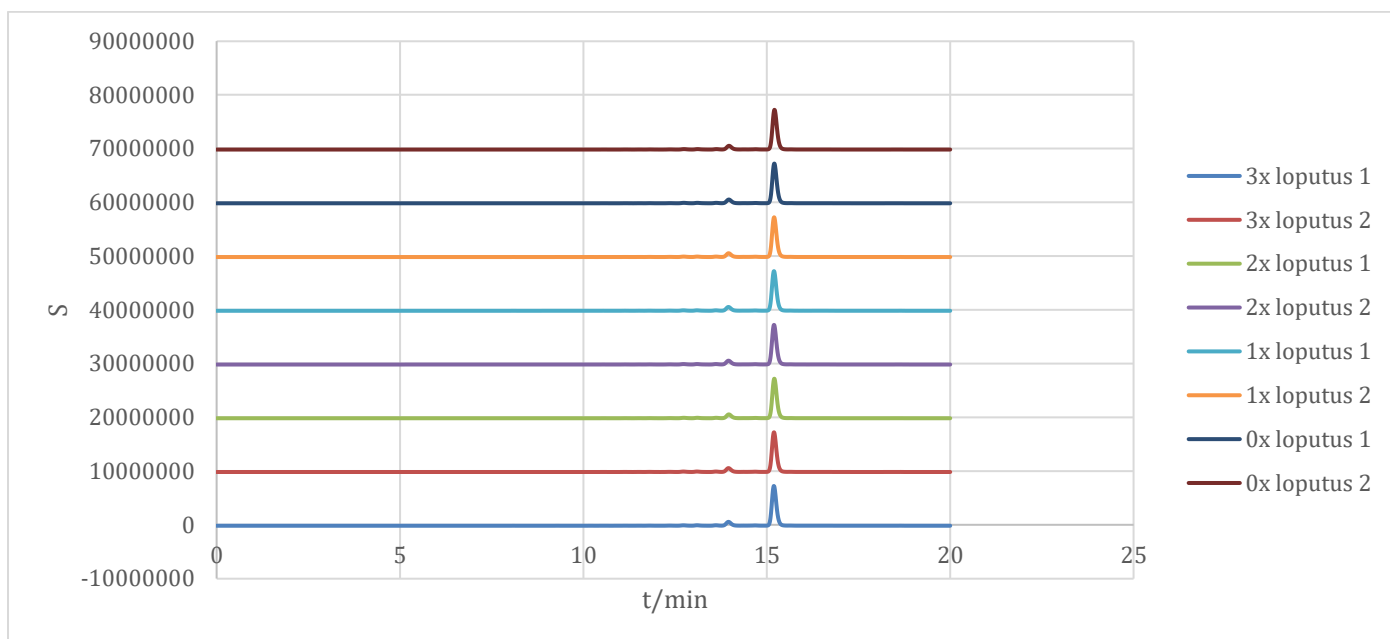
- [1] John L. Tymoczko, Jeremy M. Berg, Lubert Stryer "Biokeemia. Lühikursus" Õpik kõrgkoolidele. TTÜ Kirjastus, 2016. Lk 242
- [2] Hunter, T. (2012). Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1602), 2513–2516. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0013>
- [3] Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology*, 4(5), E127–130. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e127>
- [4] Salvi, M., Sarno, S., Cesaro, L., Nakamura, H., & Pinna, L. A. (2009). Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(5), 847–859. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.01.013>
- [5] Schwartz, P. A., & Murray, B. W. (2011). Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorganic Chemistry*, 39(5–6), 192–210. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.07.004>
- [6] The functional landscape of the human phosphoproteome. (n.d.). Retrieved August 17, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7100915/>
- [7] Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- [8] Protein Phosphorylation A practical approach. 2nd ed. Edited by D.G.Hardie. Chapter 10.2 Maria Ruzzene and Lorenzo A. Pinna, The residue and sequence specificity of protein kinases
- [9] Roskoski, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, 100, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.010>
- [10] FDA-approved protein kinase inhibitors/US Food and Drug Administration approved small molecule protein kinase inhibitors. (n.d.). Retrieved August 17, 2020, from <http://www.brimr.org/PKI/PKIs.htm>
- [11] Cozza, G., Bortolato, A., & Moro, S. (2010). How druggable is protein kinase CK2? *Medicinal Research Reviews*, 30(3), 419–462. <https://doi.org/10.1002/med.20164>

- [12] Nuñez de Villavicencio-Díaz, T., Rabalski, A. J., & Litchfield, D. W. (2017). Protein Kinase CK2: Intricate Relationships within Regulatory Cellular Networks. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/ph10010027>
- [13] Kramerov, A. A., & Ljubimov, A. V. (2012). Focus on Molecules: Protein kinase CK2. *Experimental eye research*, 101, 111–112. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.12.011>
- [14] Philips, R. M. & R. (n.d.). » What is the pH of a cell? Retrieved from <http://book.bionumbers.org/what-is-the-ph-of-a-cell/>
- [15] Pinna, L. A. (2002). Protein kinase CK2: a challenge to canons. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 20), 3873–3878. <https://doi.org/10.1242/jcs.00074>
- [16] Becher, I., Savitski, M. M., Savitski, M. F., Hopf, C., Bantscheff, M., & Drewes, G. (2013). Affinity profiling of the cellular kinome for the nucleotide cofactors ATP, ADP, and GTP. *ACS chemical biology*, 8(3), 599–607. <https://doi.org/10.1021/cb3005879>
- [17] Protein kinase CK2, wiley-blackwell 2013, L.A.Pinna (ed) Protein Kinase CK2: At the Crossroads of Pathways Controlling Cell Proliferation and Survival (Gabriel M, Litchfield DW), p 172-177.
- [18] Luo, B., Li, R., Shu, R., Wang, C., Zhang, J., & Chen, Y. (2020). Boric Acid as a Novel Homogeneous Catalyst Coupled with Ru/C for Hydrodeoxygenation of Phenolic Compounds and Raw Lignin Oil. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c00888>
- [19] Sarno, S., & Pinna, L. A. (2008). Protein kinase CK2 as a druggable target. *Molecular bioSystems*, 4(9), 889–894. <https://doi.org/10.1039/b805534c>
- [20] Testing the Safety and Tolerability of CX-4945 in Patients With Recurrent Medulloblastoma Who May or May Not Have Surgery - Full Text View - ClinicalTrials.gov. (n.d.). Retrieved August 17, 2020, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03904862>
- [21] Gilbert, H. F. (2000). *Basic concepts in biochemistry: a students survival guide* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- [22] Kratz, F., Müller, I. A., Ryppa, C., & Warnecke, A. (2008). Prodrug Strategies in Anticancer Chemotherapy. *ChemMedChem*, 3(1), 20–53. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700159>
- [23] Stella, V., Borchardt, R., Hageman, M., Oliyai, R., Maag, H., & Tilley, J. (Eds.). (2007). *Prodrugs: Challenges and Rewards*. New York: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-49785-3>

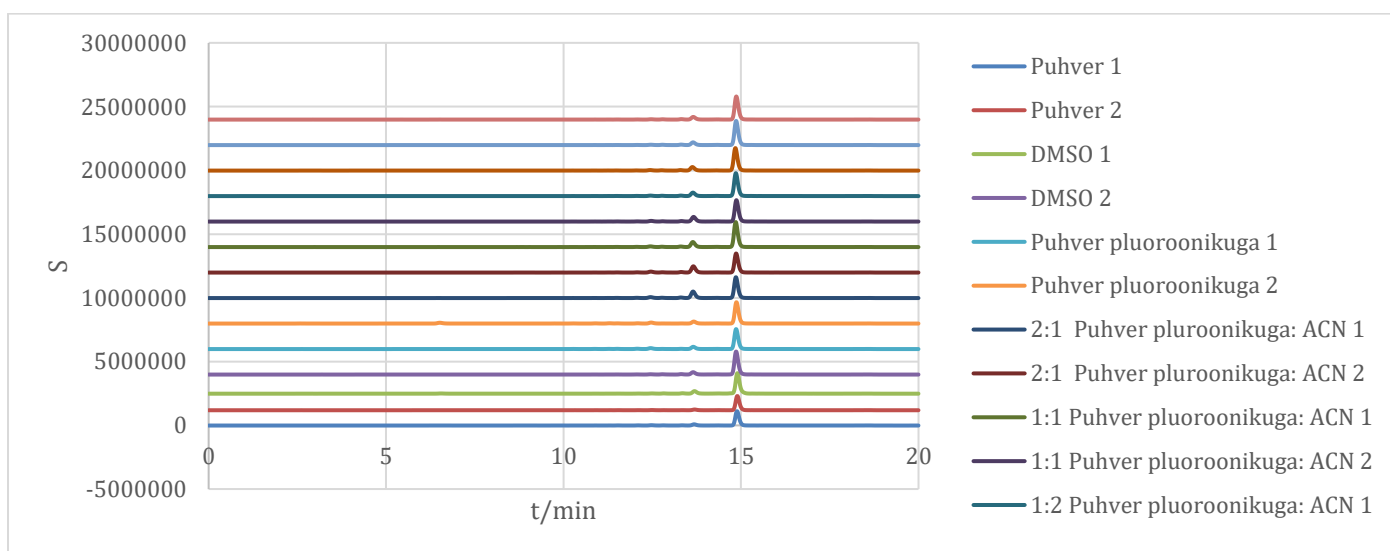
- [24] Md, B., K, R., T, C., S, W., & M, S. (2013, February 1). Loading fluorescent Ca²⁺ indicators into living cells. *Cold Spring Harbor protocols*. Cold Spring Harb Protoc. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot072801>
- [25] Tsien, R. Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, 290(5806), 527–528. <https://doi.org/10.1038/290527a0>
- [26] Pitto-Barry, A., & Barry, N. P. E. (2014). Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. *Polymer Chemistry*, 5(10), 3291–3297. <https://doi.org/10.1039/C4PY00039K>
- [27] Schultz, C. (2003). Prodrugs of biologically active phosphate esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(6), 885–898. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(02\)00552-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(02)00552-7)
- [28] Schwartz, P. A., & Murray, B. W. (2011). Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorganic Chemistry*, 39(5), 192–210. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.07.004>
- [29] Enkvist, E., Viht, K., Bischoff, N., Vahter, J., Saaver, S., Raidaru, G., ... Uri, A. (2012). A subnanomolar fluorescent probe for protein kinase CK2 interaction studies. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10(43), 8645. <https://doi.org/10.1039/c2ob26022k>
- [30] Viht, K., Saaver, S., Vahter, J., Enkvist, E., Lavogina, D., Sinijärvi, H., ... Uri, A. (2015). Acetoxymethyl Ester of Tetrabromobenzimidazole–Peptoid Conjugate for Inhibition of Protein Kinase CK2 in Living Cells. *Bioconjugate Chemistry*, 26(12), 2324–2335. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00383>
- [31] Vahter, J., Viht, K., Uri, A., & Enkvist, E. (2017). Oligo-aspartic acid conjugates with benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid scaffold as picomolar inhibitors of CK2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(7), 2277–2284. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.055>
- [32] Vahter, J., Viht, K., Uri, A., Manoharan, G. babu, & Enkvist, E. (2018). Thiazole- and selenazole-comprising high-affinity inhibitors possess bright microsecond-scale photoluminescence in complex with protein kinase CK2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(18), 5062–5068. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.09.003>
- [33] Rahnel, H., Viht, K., Lavogina, D., Mazina, O., Haljasorg, T., Enkvist, E., & Uri, A. (2017). A Selective Biligand Inhibitor of CK2 Increases Caspase-3 Activity in Cancer Cells and Inhibits Platelet Aggregation. *ChemMedChem*, 12(20), 1723–1736. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700457>

- [34] Hamad, M. I. K., Krause, M., & Wahle, P. (2015). Improving AM ester calcium dye loading efficiency. *Journal of Neuroscience Methods*, 240, 48–60.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.11.010>

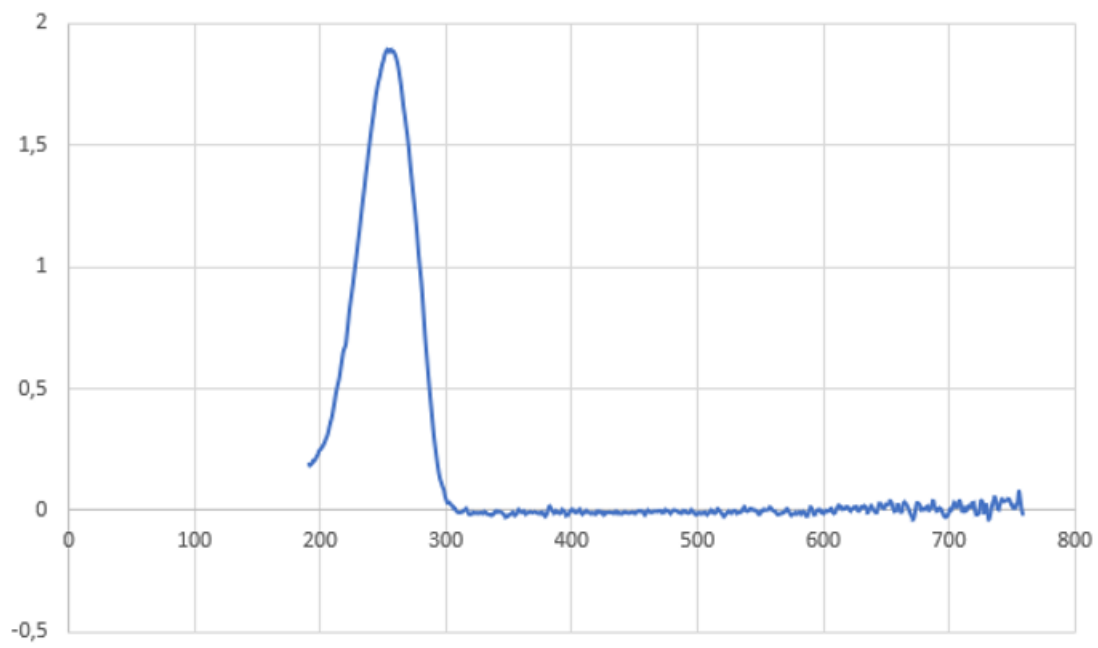
8. Lisad



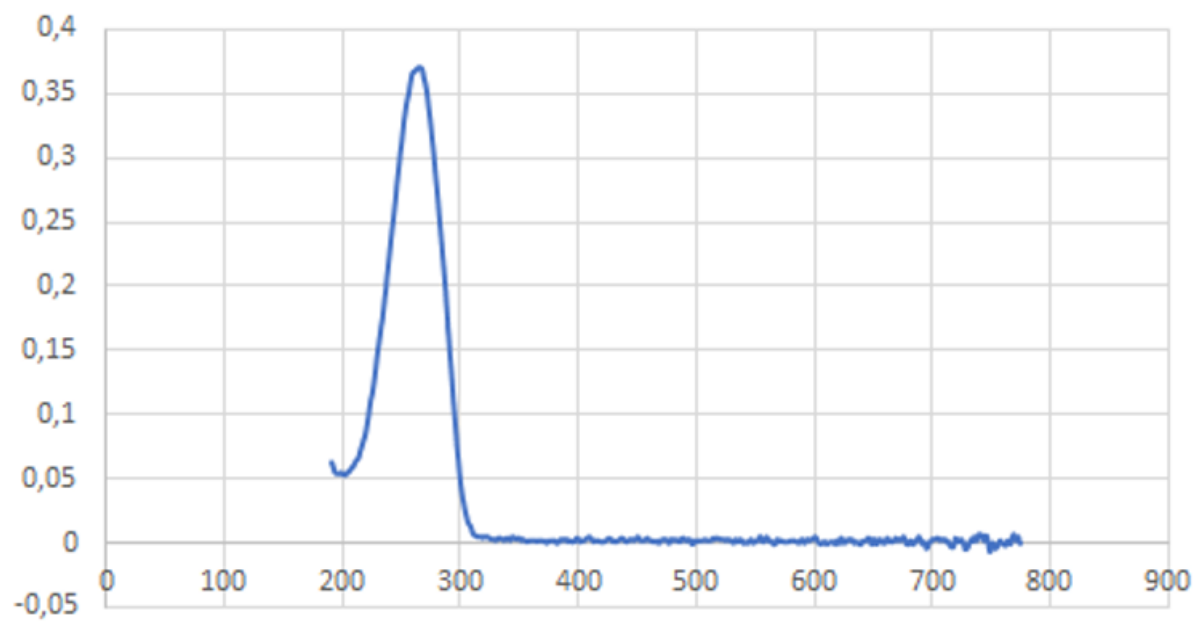
Lisa 1. ARC-775 adsorptsioon plastikule



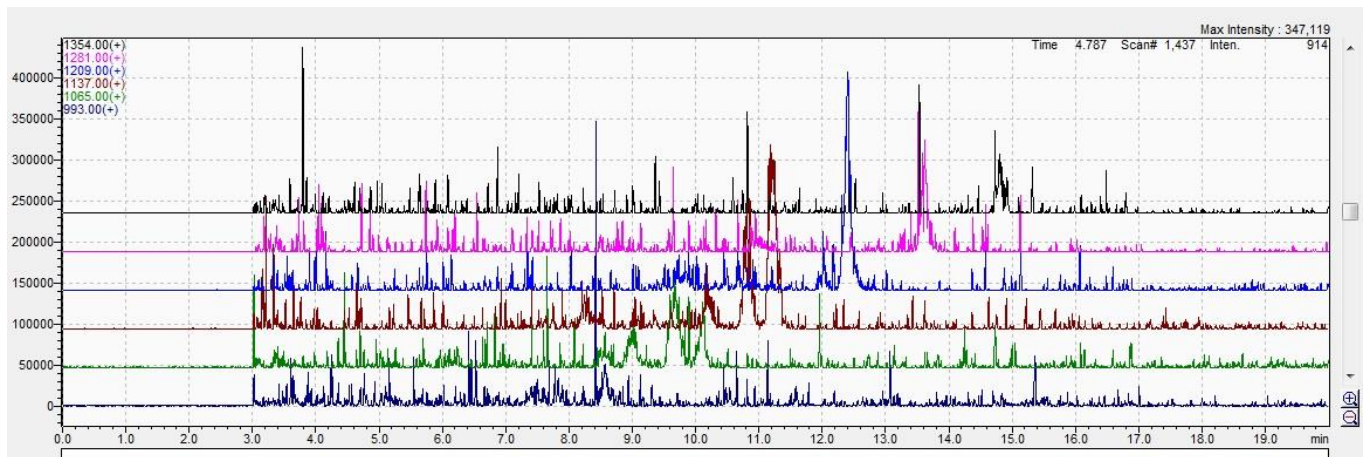
Lisa 2. ARC-775 lagunemine orgaanilistes lahustites



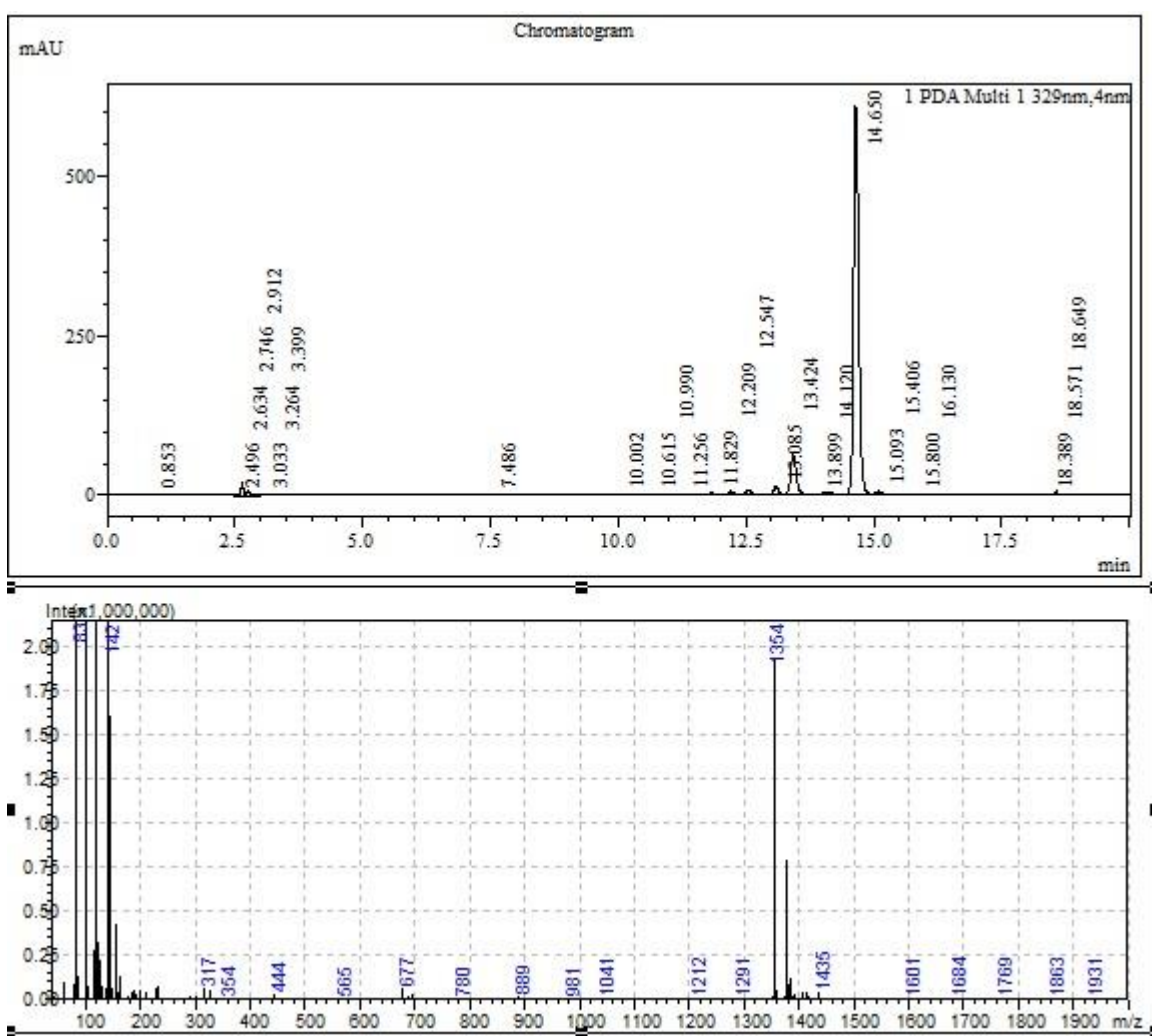
Lisa 3: ARC-775 UV-Vis spekter



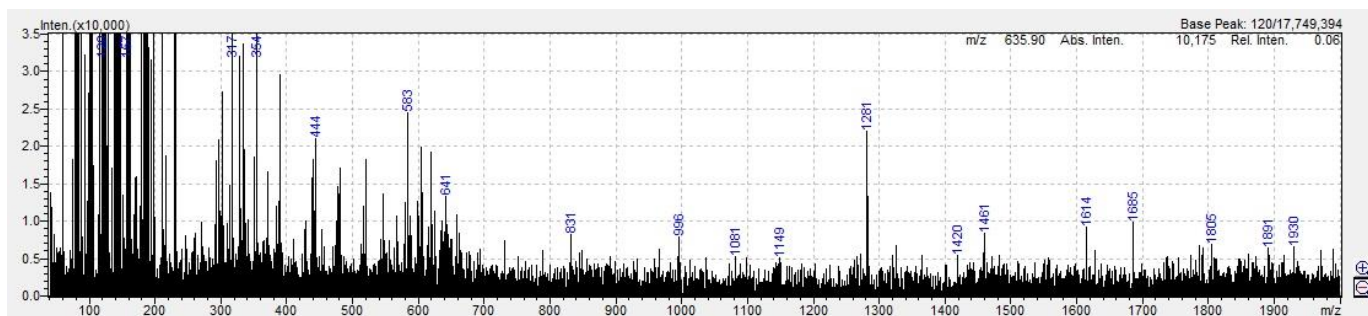
Lisa 4. ARC-772 UV-Vis spekter



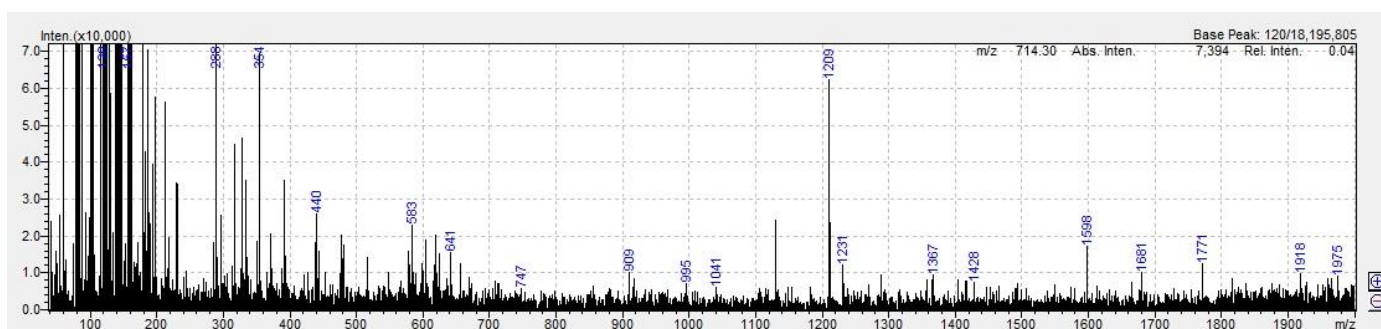
Lisa 5: Fragmentid 1354, 1281, 1209, 1137, 1065, 993



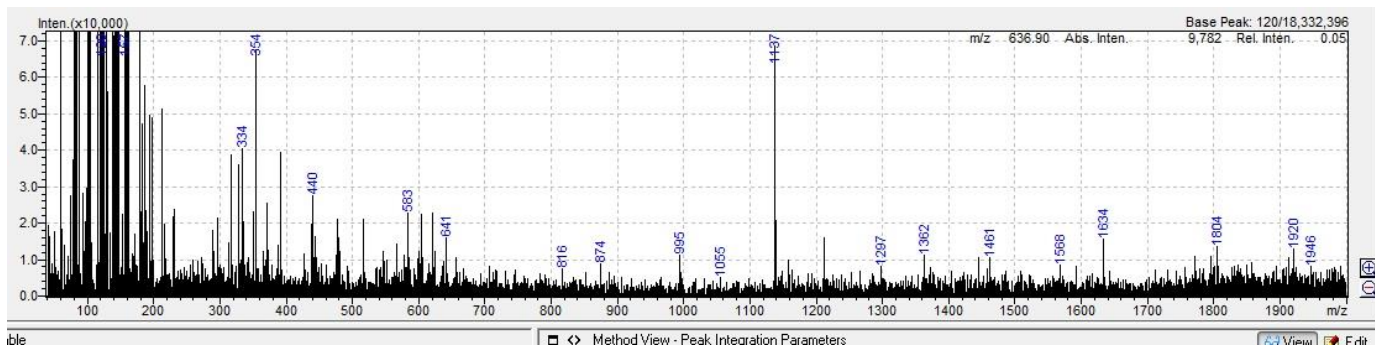
Lisa 6. 1354 fragment



Lisa 7. 1281 fragment

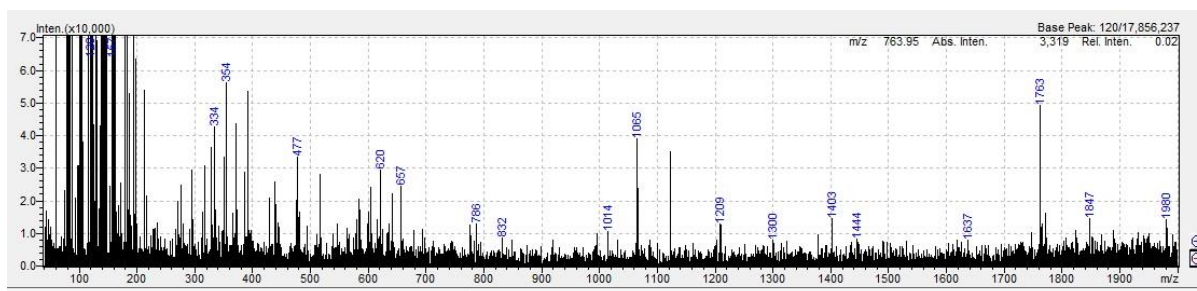


Lisa 8. 1209 fragment

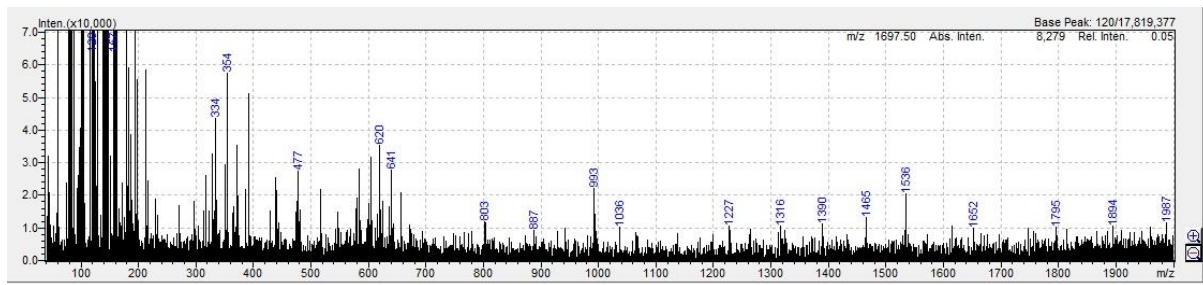


Method View - Peak Integration Parameters

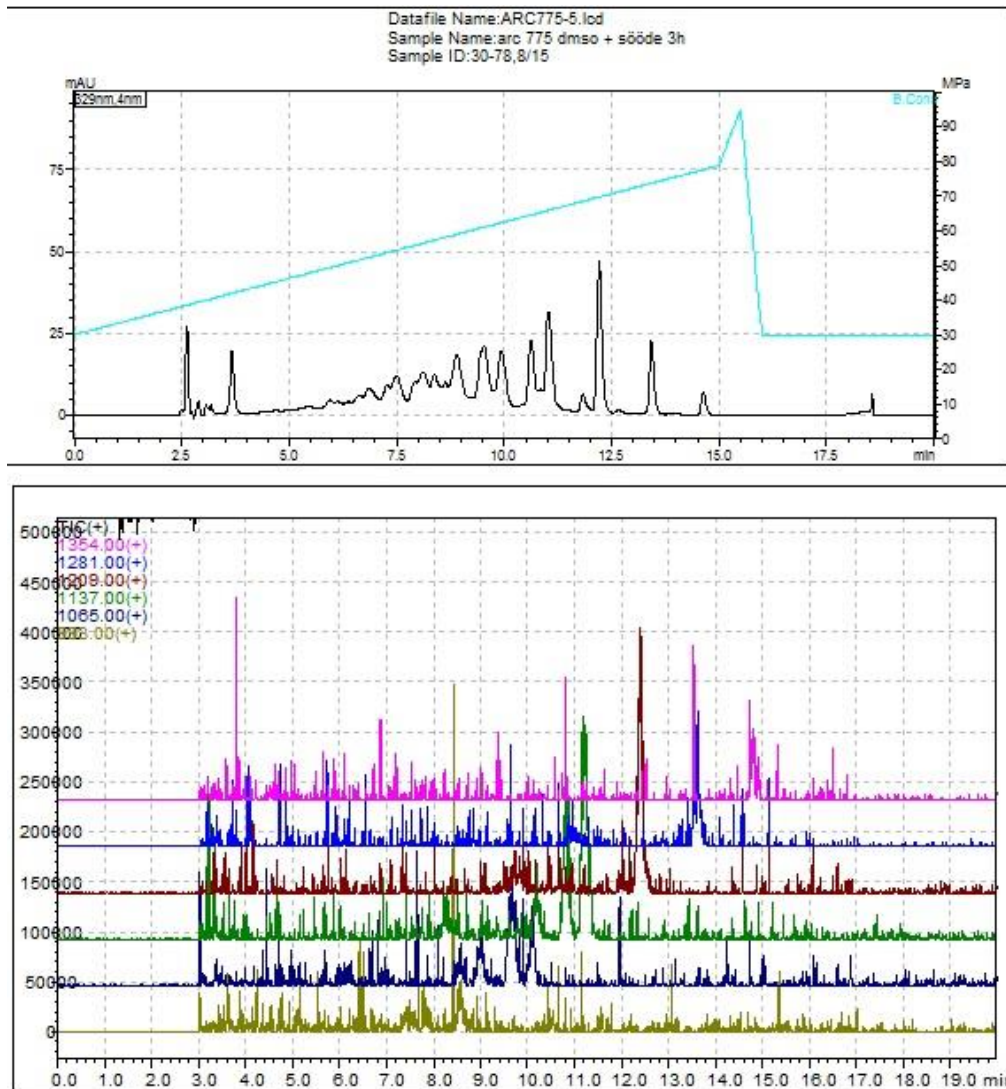
Lisa 9. 1137 fragment



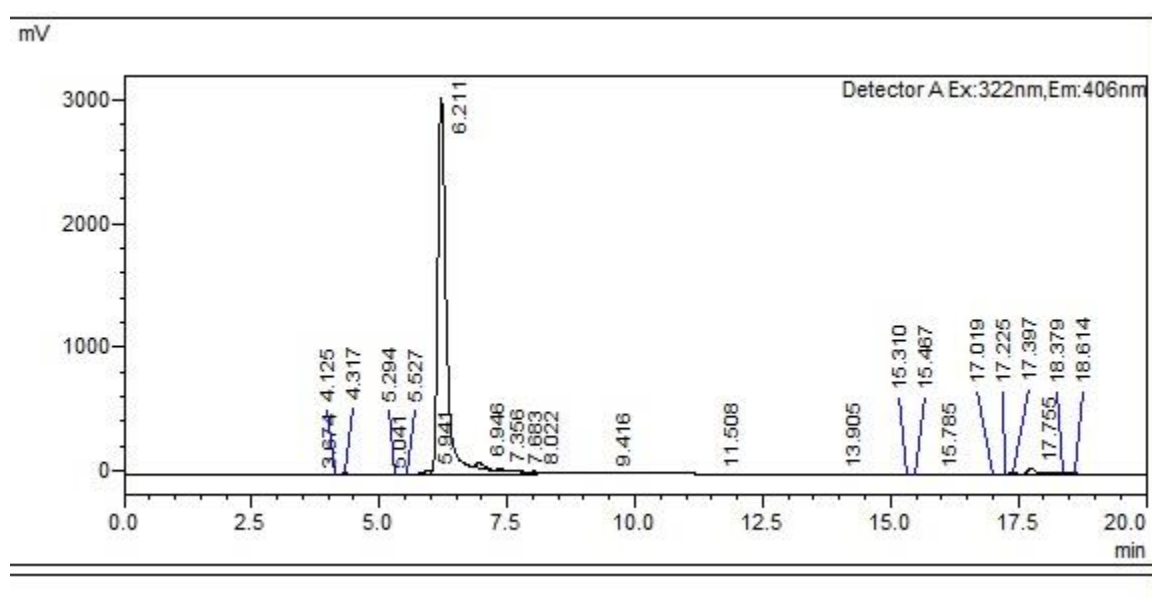
Lisa 10. 1065 fragment



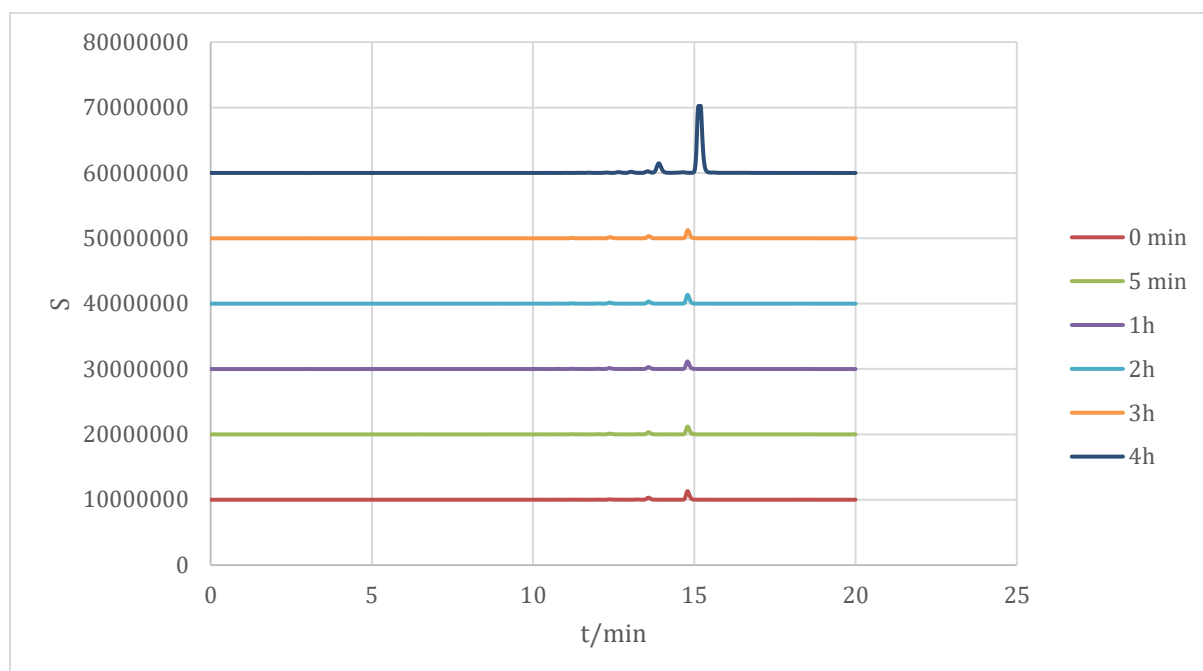
Lisa 11: 993 fragment



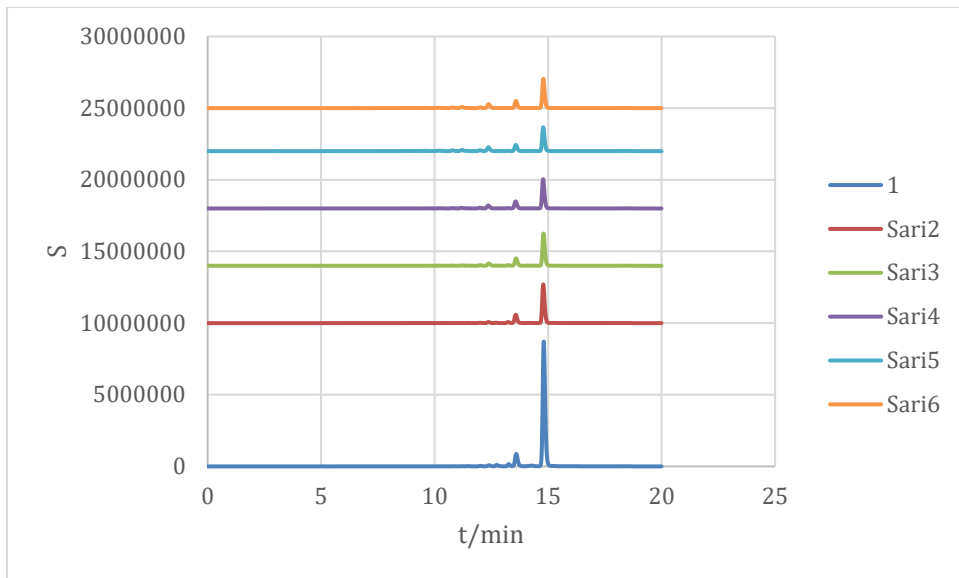
Lisa 12. Lagunenud frangmentideks (kattub ?)



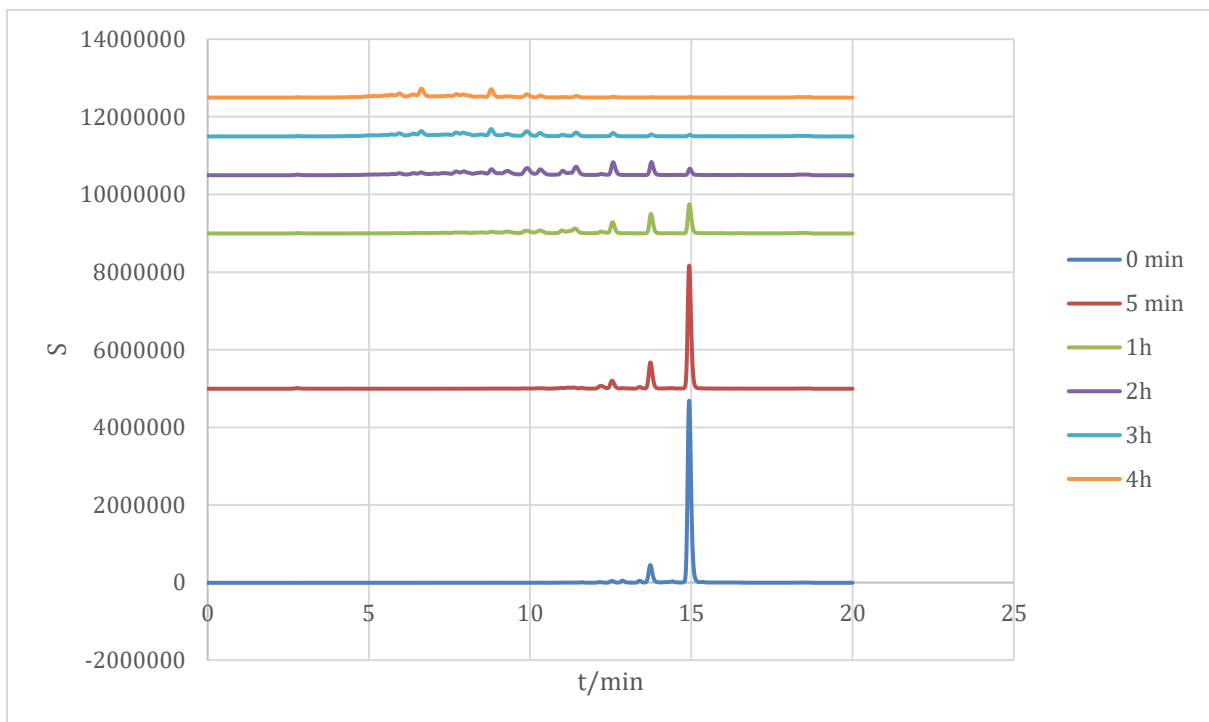
Lisa 13. ARC-772 piik



Lisa 14. Lagunemine puhvris



Lisa 15. üleöö, kas panna sisse ?



Lisa 16. Lagunemine söötmes

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Grete Metsallik,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose Proteiinkinaasi CK2 inhibiitori heksaatsetoksümetüülestri ARC-775 stabiilsus rakusöötmes,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Kaido Viht,

(juhendaja nimi)

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

autori nimi Grete Metsallik

pp.kk.aaaa 18.08.2020